



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Off nl gungsschrift**
⑩ **DE 197 52 666 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/82
A 01 H 1/00
C 12 S 3/08
A 23 K 1/14
D 21 H 11/00

⑳ Aktenzeichen: 197 52 666.7
㉔ Anmeldetag: 27. 11. 97
㉕ Offenlegungstag: 1. 7. 99

DE 197 52 666 A 1

⑦① Anmelder:
IPK Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, DE

⑦④ Vertreter:
Vossius & Partner GbR, 81675 München

⑦② Erfinder:
Herbers, Karin, 06484 Quedlinburg, DE;
Sonnewald, Uwe, 06484 Quedlinburg, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
US 55 85 545
US 54 51 514
WO 98 18 949 A2
WO 98 11 205 A2
WO 98 00 549 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Herstellung von verändertem Holz und dessen Verwendung

⑤⑦ Es werden Verfahren und Herstellung von verändertem Holz unter Verwendung von Pflanzen beschrieben, die ein rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das ein Enzym codiert, das in der Lage ist, die Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden zu verändern. Weiterhin werden Holz und Holzfasern beschrieben, die aus dem vorgenannten Verfahren gewonnen werden. Ferner werden Zusammensetzungen bereitgestellt, die derartiges Holz oder Fasern davon enthalten und Verfahren zur Verarbeitung von Zellstoff unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen, Holz und Holzfasern. Schließlich werden Verwendungen der vorgenannten Pflanzen, des Holzes und dessen Fasern sowie die oben definierten rekombinanten DNA-Moleküle in der Holz-, Papier-, Tierfuttermittel- und Brennstoffindustrie beschrieben.

DE 197 52 666 A 1



Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von verändertem Holz unter Verwendung von Pflanzen, die ein rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das ein Enzym codiert, das in der Lage ist, die Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden zu verändern. Weiterhin betrifft die Erfindung Holz und Holzfasern, die aus dem vorgenannten Verfahren gewonnen werden. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Zusammensetzungen, die derartiges Holz oder Fasern davon enthalten und Verfahren zur Verarbeitung von Zellstoff unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen, Holz und Holzfasern. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Verwendungen der vorgenannten Pflanzen, des Holzes und dessen Fasern sowie der oben definierten rekombinanten DNA-Moleküle in der Holz-, Papier-, Nahrungsmittel-, Tierfuttermittel- und Brennstoffindustrie.

Holz ist ein wertvoller Rohstoff, der für eine Vielzahl von Produkten als Ausgangsstoff dient und auch in der chemischen Industrie Anwendung findet. Bei dem chemischen "Pulping" im Rahmen der Papierherstellung handelt es sich z. B. um einen Prozeß, bei dem die Bestandteile des Holzes voneinander getrennt werden, damit diese für industrielle Prozessierung geeignet vorliegen. Die Entfernung des Lignins zur Freisetzung von Zellulose aus Holzmaterial bei der Papierherstellung kann entweder durch Prozesse, die Sulfat (Kraft) oder Sulfit beinhalten, bewerkstelligt werden. Bei dem Kraft Pulping werden etwa 90% des Lignins während des alkalischen Kochens hydrolysiert. Die zurückbleibenden 10% sind hauptsächlich für die braune Farbe von Kraft Pulpe und ungebleichtem Papier verantwortlich. Man nimmt an, daß Lignin-Kohlenhydratkomplexe die Entfernung des restlichen Lignins aus der Pulpe erschweren. Es kommt hinzu, daß gelöste Xylane und Lignine die Tendenz zeigen, an der Oberfläche von Zellulose Mikrofibrillen zu adsorbieren, wenn die Alkalikonzentration gegen Ende des Kraft Prozesses abnimmt. Primäres Ziel des Bleichens ist es dann, das restliche Lignin aus der Pulpe zu entfernen, ohne die Kohlenhydrate der Pulpe, besonders die Zellulose, zu degradieren. Herkömmlicherweise, verwendet man für das Bleichen chemischer Pulpe Chlor oder Chlordioxid.

Die Effluente des chemischen Pulpings enthalten große Mengen chlorhaltiger organischer Komponenten, die toxische, mutagene und karzinogene Wirkungen aufweisen. Die steigende öffentlichen Besorgnis zu dieser Problematik zwingt die Industrie, sich alternativen Technologien zuzuwenden. Aus diesem Grund wurde als eine Alternative zum chemischen Pulping in den letzten Jahren das Biopulping untersucht. Es handelt sich dabei um die Behandlung von Holzstückchen mit Lignin-abbauenden Organismen (z. B. Pilze). Darüber hinaus wurde das durch Enzyme erleichterte Pulping ("Enzyme-aided Pulping") durch Zugabe von Hemizellulasen zur Pulpe untersucht. Das Konzept des verbesserten Pulpings durch Enzymzugabe beruhte auf der Erkenntnis, daß begrenzte Hydrolyse der Hemizellulose in der Pulpe durch Hydrolasen, vor allem Xylanasen, die Extrahierbarkeit des Lignins aus der Kraft Pulpe während des anschließenden Bleiche Prozesses erleichtern. Die Vorbehandlung mit Xylanasen erlaubt die Verwendung von geringeren Chlorgehalten während des Bleichvorganges von Kraftpulpe. Die Hemizellulose-Behandlungen, zusammen mit chemischer Extraktion, führt zu einer signifikanten Verringerung des restlichen Lignins in der Pulpe. Die Effizienz von Xylanasen basiert auf der Zusammensetzung der Hemizellulose im Holz. Der Xylan-Bestandteil macht 5-11% des Trockengewichtes in Kiefern (Weichholz) und 22 bis 30% in Birke (Hartholz) aus. Die verbesserte Bleichbarkeit der Pulpe nach Vorbehandlung der Pulpe ist wahrscheinlich auf die Hydrolyse der Lignin-Kohlenhydrat Verbindungen zurückzuführen. Insgesamt haben die enzymatischen Vorbehandlungen dazu geführt, daß der Verbrauch an Chemikalien und die Umweltbelastungen reduziert, dagegen die finale Helligkeit der Pulpe erhöht werden konnte (zur Übersicht, siehe Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, vol ed.: K.E.L. Erikson, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology Vol 57, ed., T. Scheper, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1997). Allerdings ist die Herstellung der hemizellulolytischen Enzyme, z. B. die der Xylanasen, die bei der Papierherstellung eingesetzt werden (in Flüssigkultur durch Bakterien (vor allem Bacillus) und Pilze (vor allem Trichoderma)) kostspielig und aufwendig. Zudem müssen beim Biopulping mit Organismen diese so modifiziert sein, daß sie nicht Zellulose abbauen. Außerdem müssen sie kultiviert werden, was wiederum zeitintensiv und kostspielig ist. Ein weiterer Nachteil des "Enzyme-aided" Pulpings kann in einer begrenzten Zugänglichkeit der Holzfasern für das Enzym bestehen. Die mittlere Porengröße für externe Makromoleküle ist auf etwa 1 nm begrenzt. Dies könnte das Eindringen von Enzymen während des chemischen Pulpings, auch wenn bei diesem Prozeß die Porengrößen leicht vergrößert werden, verhindern. Gleichfalls, beeinflussen viele Faktoren Enzymreaktionen (pH, Temperatur, elektrochemische Interaktionen während des Pulpings, die Art der Pulpe, d. h. Quelle, Produktionsmethode wie Mahlen etc.), die unter Umständen nicht kompatibel mit den Bedingungen der anderen Verfahrensschritte sind, was ihre Effizienz stark beeinträchtigen kann.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die effiziente und kostengünstige Produktion von Holzmaterial erlauben, das z. B. in der Zellstoffindustrie eingesetzt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von verändertem Holz umfassend:

- (a) Einführung eines rekombinanten DNA-Moleküls in Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzen, wobei das rekombinante DNA-Molekül ein Enzym codiert, das in der Lage ist, Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden zu verändern;
- (b) Regeneration einer transgenen Pflanze aus der Pflanzenzelle, Pflanzengewebe oder Pflanze aus Schritt (a); und
- (c) Kultivierung der Pflanze aus Schritt (b) unter Bedingungen die
 - (i) die Bildung von Holz, und
 - (ii) die Expression des Enzyms erlauben.

Der Begriff "Holz" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt neben Holz im herkömmlichen Sinne, das aus Tracheiden, Tracheen und Holzfasern besteht und z. B. von Nadelbäumen oder Laubbäumen und Sträuchern gebildet wird, auch andere Formen von Mark-, Holz- und Baststrahlen wie sie z. B. beim sekundären Dickenwachstum bei einigen monokotyledonen Pflanzen anzutreffen sind und auch Formen von sekundärem Phloem wie sie in Bast vorgefunden werden.

Für den Zweck der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff Holz ebenfalls sekundäres Abschlußgewebe wie Kork.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Enzym, das in der Lage ist, Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden zu verändern, ein Enzym verstanden, das in der Lage ist, Strukturbestandteile von pflanzlichen Zellwänden zu modifizieren. Dabei beschränken sich die Strukturbestandteile von pflanzlichen Zellwänden nicht nur auf Strukturpolysaccharide wie z. B. Lignine, Zellulose, Hemizellulosen und Pektinstoffe, sondern umfassen auch Strukturproteine und Proteoglykane. Dabei umfassen Hemizellulosen beispielsweise Xylane, Glucomannane, Mannane, Galactomannane, Glucuronomannane, Xyloglucane, Callose, β -1,3,1-4-glucan und Arabinogalactan II. Pektine beinhalten Komponenten wie Rhamnoglacturonane, Arabinane, Galactane und Galacturone. Die Veränderung des Zellwandbestandteils durch das Enzym beinhaltet unter anderem, allerdings nicht ausschließlich, die Hydrolyse von hetero- oder homomeren Polyglycanen oder anderer, z. B. einer der vorgenannten Zellwandbestandteile, die Hydrolyse bzw. Spaltung durch andere Mechanismen sowie die enzymatischen Veränderung von einer der vorgenannten Zellwandbestandteile oder der Polymer-Glykan-Komplexe.

Die in Schritt (c) des Verfahrens eingesetzten Pflanzen sind dadurch gekennzeichnet, daß das eingeführte rekombinante DNA-Molekül entweder heterolog in Bezug auf die transformierte Zelle oder Pflanze ist, d. h. natürlicherweise nicht in diesen Zellen oder Pflanzen vorkommt, oder an einem anderen Ort im Genom lokalisiert ist als die entsprechende natürlicherweise auftretende Sequenz.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß unter Gewächshausbedingungen Xylanase-exprimierende Pflanzen in Bezug auf Zellwand Charakteristika unbeeinträchtigt sind, signifikante Zellwandveränderungen bei extensiver Bildung von Sekundärzellwänden und Holz unter Freilandbedingungen auftreten. Untersuchungen an transgenen Tabakpflanzen (Samsun NN), die konstitutiv eine thermostabile Xylanase aus *Clostridium thermocellum* (XynZ) in der Zellwand exprimierten (Herbers (1995) *BIO/TECHNOLOGY* 13, 63–66) ergaben, daß unter Gewächshausbedingungen trotz der Bildung großer Mengen aktiver Xylanase Z in den transgenen Pflanzen, diese Pflanzen phänotypisch den nicht-transformierten Kontrollpflanzen entsprachen (Herbers (1995)). Die Abwesenheit von durch Zellwandmodifikation und/oder Xylan-Degradation bedingten phänotypischen Veränderungen in diesen transgenen Pflanzen wurde darauf zurückgeführt, daß die Zellwandbestandteile möglicherweise den Enzymen *in situ* nicht zugänglich sind (Herbers und Sonnewald, "Structure, Occurrence and Significance of Xylans in Plants" in *Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins* (1996), 191–200, ed. Owen and Pen, John Wiley & Sons NY USA).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden die vorgenannten transgenen Pflanzen einem Freilandexperiment unterzogen. Jeweils 200 Pflanzen der zwei stärksten exprimierenden homozygoten Linien (Nr. 34 und 46) wurden ausgepflanzt und mit jeweils 200 Kontrollpflanzen verglichen. Es zeigte sich, daß die transgenen Pflanzen im Gegensatz zu den Gewächshauspflanzen erhebliche Wachstumseinbußen aufwiesen. Die am stärksten exprimierende Linie Nr. 46 erreichte nur ca. 62%, Linie Nr. 34 etwa 82% der Stengelhöhe von Wildtyp-Pflanzen (Tabelle 1).

Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden, ergaben, daß die Rinde zwischen Wildtyp- und Kontrollpflanzen vergleichbar ist, während das Holz der transgenen eine deutliche Abnahme des Trockengewichtes, und das Mark eine leichte Abnahme des prozentualen Trockengewichtes gegenüber den Wildtyp-Pflanzen aufwies (Tabelle 3). Dies bedeutet, daß der Stengel, insbesondere der Holzanteil in den transgenen Pflanzen verändert ist. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß sowohl Rinde, Mark als auch Holz der transgenen Pflanzen signifikante Xylanase-Aktivität enthielten. Dies läßt den Schluß zu, daß die *in vivo* aktive Xylanase zu Veränderungen des Stengels insbesondere des Holzes führt.

Aus der obigen Darlegung wird ersichtlich, daß die vorliegende Erfindung die Produktion von modifiziertem Holz *in vitro* und *in situ* erlaubt. Die Erfindung umfaßt somit ein Verfahren, Zellwand-modifizierende Enzyme in Pflanzenstengeln und -stämmen zu produzieren, indem Pflanzen mit einem pflanzlichen Expressionsvektor transformiert werden. Dieser Vektor enthält einen Promotor, eine DNA Sequenz, die ein Enzym, wie es oben definiert ist oder einen aktiven Teil des Enzyms kodiert, und eine Sequenz, die das Enzym in ein zelluläres Kompartiment dirigiert. Die transformierten Pflanzen produzieren *in vivo* modifiziertes Holz oder Stengel (bzw. Stamm)-Zusammensetzungen, die für die Veränderungen von Holzbiomasse geeignet sind. Diese Veränderungen können Eigenschaften betreffen, die bei der Holz- und Papierherstellung, wie auch bei der Herstellung von Nahrungs- und Futtermitteln, von Bedeutung sind. In dem Fall, wo das Enzym in einem zellulären Kompartiment, das sich von der Zellwand unterscheidet, exprimiert wird, können die Zellwände *in situ* nach Aufbrechen der Zellen modifiziert werden.

DNA-Sequenzen, die ein Zellwand-modifizierendes Enzym codieren, sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt (siehe z. B. Knowles, *Trends Biotechnology* 5 (1987), 255–261; Gilkes, *Microbiological Reviews* 55(2) (1991), 303–315; Biely, *Trends Biotechnology* 3(11) (1985), 286–290; Wong, *Microbiological Reviews* 52(3) (1988), 305–317) und können aus natürlichen Quellen isoliert werden, z. B. Pilzen und Bakterien, oder können nach bekannten Verfahren synthetisiert werden.

Mittels gängiger molekularbiologischer Techniken ist es möglich (siehe z. B. Sambrook, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), verschiedenartige Mutationen in die DNA-Sequenz, die ein Zellwand-modifiziertes Enzym codiert, einzuführen, wodurch es zur Synthese von Enzymen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen z. B. durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'-Ende der codierenden DNA-Sequenz, die Synthese entsprechend verkürzter Enzyme oder deren enzymatisch aktiver Teil erreicht werden kann. Ferner ist es möglich, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun, *EMBO J.* 11(1992), 3219–3227; Wolter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 846–850; Sonnewald, *Plant J.* 1(1991), 95–106).

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z. B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten K_m -Wert besitzen oder nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizie-

rung unterliegen.

Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die rekombinanten DNA-Moleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook, 1989, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Neben dem rekombinanten DNA-Molekül, das für ein zur Zellwandmodifikation befähigtes Enzym oder Protein codiert, kann die Pflanze, die in einem der erfindungsgemäßen Verfahren oder Verwendungen benutzt oder hergestellt wird, weitere rekombinante DNA-Moleküle enthalten, die z. B. für den Pflanzenschutz oder Qualitätssteigerungen der Pflanze oder deren Ernteprodukte benutzt werden können. Beispiele für Pflanzenschutzmaßnahmen sind: (i) Herbizidtoleranz (DE-A-37 01 623; Stalker (1988) *Science* 242, 419), (ii) Insektenresistenz (Vaek (1987) *Plant Cell* 5, 159-169), (iii) Virusresistenz (Powell (1986) *Science* 232, 738-743) und (vi) Ozon-resistenz (Van Camp (1994) *BioTech.* 12, 165-168). Beispiele für Qualitätssteigerungen sind: (i) Erhöhung der Haltbarkeit von Früchten (Oeller (1991) *Science* 254, 437-439), (ii) Erhöhung der Stärkeproduktion in Kartoffelknollen (Stark (1992) *Science* 242, 419), (iii) Veränderung der Stärke- (Visser (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225, 289-296) und Lipidzusammensetzung (Voelker (1992) *Science* 257, 72-74) und (iv) Produktion pflanzenfremder Polymere (Porier (1992) *Science* 256, 520-523).

Grundvoraussetzung für die Erzeugung transgener Pflanzen ist die Verfügbarkeit geeigneter Transformationssysteme. Zur Transformation stehen derzeit mehrere Verfahren zur Verfügung. Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Transformation dikotyledoner Pflanzen ist der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer.

Hierbei wird die natürliche Fähigkeit des Bodenbakteriums ausgenutzt, genetisches Material in das pflanzliche Genom zu integrieren. Weitere geeignete Verfahren sind beispielsweise Protoplasten-Transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Elektroporation, Sonikation oder Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, Vakuumfiltration von Samen und biolistischer Gentransfer (zur Übersicht: siehe z. B. Potrykus, *Physiol. Plant* (1990), 269-273 und Christou (1996) *Trends in Plant Science* 1, 423-431).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 491-506; Hiei, *Plant J.* 6 (1994), 271-282; Bytebier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 5345-5349; Raineri, *Bio/Technology* 8 (1990), 33-38; Gould, *Plant Physiol.* 95 (1991), 426-434; Mooney, *Plant, Cell Tiss. & Org. Cult.* 25 (1991), 209-218; Li, *Plant Mol. Biol.* 20 (1992), 1037-1048). Die Methoden zur Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z. B. Christou (1996) *Trends in Plant Science* 1, 423-431; Willmitzer, L., 1993 *Transgenic plants*. In: *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge). Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne, *Euphytica* 85 (1995), 35-44). Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari, *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149-178). Der Fachmann kann auf die Marker zur Selektion transformierter Pflanzenzellen, Pflanzengewebe und Pflanzen zurückgreifen. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. In Abhängigkeit des gewählten Promotors (z. B. 35S CaMV) sind auch die adulten Pflanzen resistent gegen das Selektionsmittel und können durch Gabe dieser Verbindung selektioniert werden. Bei Verwendung von z. B. gewebespezifischen Promotoren entfällt diese Möglichkeit und der Fachmann kann z. B. auf molekularbiologische Methoden wie PCR zurückgreifen, um diese Pflanzen zu identifizieren. Auf der anderen Seite kann der Fachmann natürlich auch, z. B. nach Selbstung oder Rückkreuzung gegen den Elter, Samen solcher Pflanzen auf selektiven Medien auslegen und anhand der Keimfähigkeit dieser Samen oder Überleben der Pflanzen in einem späteren Stadium der Entwicklung (abhängig vom gewählten Promotor) rückschließen, ob die Pflanzen transgen sind oder nicht. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d. h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen, die in der Lage sind, Holz zu bilden. Bevorzugt handelt es sich um Nadel- oder Laubbäume und Sträucher. Geeignete Transformationssysteme für solche Pflanzen sind z. B. in Leple, *Plant Cell Reports* 11(1992), 137-141, beschrieben.

Da unabhängig vom Transformationsverfahren nur wenige Zellen die gewünschten Eigenschaften tragen, wird in herkömmlicher Weise neben dem Zielgen ein selektionierbarer Marker in das pflanzliche Genom integriert, der die Identifizierung transgener Zellen ermöglicht. Derzeit werden zur Selektion transformierter Pflanzenzellen vornehmlich Gene eingesetzt, die eine Herbizid- oder Antibiotikateranz vermitteln. Geeignete Resistenzgene sind beispielsweise das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, das Resistenz gegen das Totalherbizid Phosphinothricin vermittelt (De Block (1987) *EMBO J.* 6, 2513-2518) oder das nptII-Gen aus dem Transposon Tn5 von *Escherichia coli*, das Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin bewirkt (Herrera-Estrella (1983) *EMBO J.* 2, 987-995). Weitere Selektionssysteme sind z. B. Expression einer Mannose-6-Phosphat Isomerase und positive Selektion auf Mannose-haltigen Nährmedien (WO 94/20627) und Expression einer 2-Desoxyglucose-6-Phosphat (2-DOG-6-P) Phosphatase und Selektion mit nicht-metabolisierbaren glucoseanalogen Verbindungen wie 2-DOG (EP 97 10 58 55.7). Ein weiteres Verfahren nutzt die Fähigkeit

einer Deaminase aus *Aspergillus terreus* aus, das Insektizid Blasticidin S zu detoxifizieren (Tamura (1995) Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 2336–2338). Natürlich weiß der Fachmann, daß der Selektionsmarker nicht unbedingt in dem Vektor, der das rekombinante DNA-Molekül enthält, anwesend sein muß, sondern auch mit diesen co-transformiert werden kann (Lyznik (1989) Plant Mol. Biol. 13, 151–161; Peng (1995) Plant Mol. Biol. 27, 91–104). Diese Möglichkeit bietet sich zum Beispiel an, wenn keine physikalische Kopplung des Markergens und der zu übertragenden Information gewünscht wird. In diesem Fall können nach der Selektion der primären transgenen Pflanze das Markergen und die gewünschte Information in nachfolgenden Kreuzungen unabhängig voneinander segregieren. Eine weitere Strategie, markerfreie transgene Pflanzen zu erzeugen, ist die Verwendung von Sequenz-spezifischen Rekombinasen. Zu diesem Zweck sind z. B. zwei Strategien einsetzbar: (i) Re-Transformation einer Rekombinase exprimierenden Ausgangslinie und Auskreuzung der Rekombinase nach erfolgter Entfernung des Selektionsmarkers, welches mit dem gewünschten Gen assoziiert war. (ii) Co-Transformation mit anschließender Auskreuzung. Voraussetzung für diese Rekombinase-Strategie sind (i) Flankierung des Selektionsmarkers mit Erkennungssequenzen für die Rekombinase und (ii) eine Rekombinase, die in Pflanzen aktiv ist und keine Pflanzen-eigenen Sequenzen zur Rekombination nutzt. Derartige Verfahren kann der Fachmann dem Stand der Technik entnehmen, z. B. RecA (Reiss (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3094–3098), Cre/lox (Bayley (1992) Plant Mol. Biol. 18, 353–361), FLP/FRT (Lloyd (1994) Mol. Gen. Genet. 242, 653–657), Gin (Maeser (1991) Mol. Gen. Genet. 230, 170–176) und RIRS (Onouchi (1991) Nucl. Acids Res. 19, 6373–6378).

Die Bedingungen zur Kultivierung der Pflanzen werden so gewählt, daß die Holzbildung und wenigstens zu einem bestimmten Zeitpunkt die Expression des Enzyms gewährleistet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform findet die Kultivierung unter Freilandbedingungen statt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Pflanze Tabak, Pinie, Pappel, Eukalyptus, Erbse, Klee, eine Getreidepflanze oder ein Laub- oder Nadelbaum.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Enzym ein hydrolytisches Enzym, vorzugsweise eine Cellulase, Hemicellulase, besonders bevorzugt eine Pektinase, Xylanase, Mannanase oder ein Lignin-degradierendes Enzym, z. B. Phenolperoxidase oder Laccase. Wie in Herbers et al. (1995) beschrieben, kann die Expression einer verkürzten Form des Enzyms vorteilhaft für dessen Stabilität und/oder Prozessierung in der Pflanzen- bzw. Pflanzenzellen sein. Außerdem kann es vorteilhaft sein, das Enzym in einer de- oder unglykosilierten Form zu exprimieren. Das kann z. B. durch Aminosäuredeletion und/oder -Substitution der Glycosilierungsstellen in der Aminosäuresequenz des Enzyms erreicht werden. Gleichfalls besteht die Möglichkeit, das Enzym als Fusionsprotein zu exprimieren. Diese Ausführungsform bietet sich z. B. an, wenn verschiedene enzymatische Aktivitäten in einem Protein vereint werden sollen, beispielsweise die Kombination zellulolytischer mit hemizellulolytischer Aktivitäten für eine effiziente Spaltung von Ligno-Glykan-Komplexen. Bei der Kombination von Parentalgenen, die für Proteine mit verschiedenen Eigenschaften kodieren, beispielsweise im Hinblick auf Thermostabilität und Substratspezifität, können Hybridgene entstehen, deren Translationsprodukt beide Eigenschaften beinhalten (Olsen, Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 177–185).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das DNA-Molekül funktionell mit einer DNA-Sequenz verknüpft ist, die ein Signalpeptid für die Zellwand, die Vacuole, ein Plastid oder Mitochondrium oder das endoplasmatische Reticulum codiert. Es ist dabei vorteilhaft, wenn das Signalpeptid in der Lage ist, das Enzym in ein Zellkompartiment zu dirigieren. Bevorzugte Beispiele für geeignete Signalpeptide sind z. B. das Proteinaseinhibitor-II-Signalpeptid, das Patatin-Vacuole-Signalpeptid oder das plastidiäre Transketolase-Transitpeptid ist. Vorzugsweise ist das Zellkompartiment der apoplastische Raum oder die Vacuole.

Zur Expression der Zellwand-modifizierenden Enzyme in Pflanzen sind die sie codierenden Nucleotidsequenzen mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Sinnvoll für die Expression der Zellwand-verändernden Enzyme in den genannten Bereichen erscheinen Expressionsmuster, die je nach Anwendung konstitutiv, organspezifisch oder induzierbar sein können. Vorteilhaft sind in diesem Zusammenhang der 35S Promotor des Blumenkohlmosaik-Virus und der Ubiquitin-Promotor für eine konstitutive Expression, für eine blattspezifische Expression in source-Geweben der Promotor der zytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase (Marcus Ebnet, 1996, Inaugural-Dissertation an der FU Berlin, Expressionsanalyse des Promotors einer zytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen) und für eine samenspezifische Expression der Phaseolin Promotor aus Bohne (Sengupta-Gopalan, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3320–3324). Vorteilhaft kann eine induzierbare Expression sein (zusammengefaßt in Ward (1993) Plant Mol. Biol. 22, 361–366). Eine Übersicht weiterer in Frage kommender Promotoren ist z. B. in Ward (1993) Plant Mol. Biol. 22, 361–366 gegeben. Ferner ist eine Transkriptions-Terminationssequenz vorhanden, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dienen kann, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente, z. B. der Terminator des Octopinsynthasegens aus Agrobakterien, sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen, EMBO J. 8 (1989), 23–29) und sind beliebig austauschbar.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Expression oder Aktivität des Enzyms induzierbar, vorzugsweise durch Temperatur, pH-Wert, organische oder anorganische Verbindungen, oder durch Dekompartimentierung. Für den Fall der Dekompartimentierung ist daran gedacht, das Enzym in einem anderen Zellkompartiment, als die Zellwand zu exprimieren. Bei sich anschließenden Methoden, die zum Aufschluß von Zellen durch beispielsweise mechanisches Mahlen oder Zerreiben, Hitzebehandlung usw. führen, wird das Enzym aus dem entsprechenden Kompartiment freigesetzt und kann enzymatisch an der Zellwand angreifen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Holz, daß nach einem der beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist oder Fasern davon sowie Zusammensetzungen, die das Holz oder Fasern davon enthalten. Derartige Zusammensetzungen können weiterhin Pflanzenbiomasse, vorzugsweise Holz oder Fasern davon enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Zellstoff, umfassend die Verarbeitung des erfindungsgemäßen Holzes oder Fasern davon oder einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung unter geeigneten Reaktionsbedingungen. Derartige Reaktionsbedingungen sind z. B. beschrieben in WO 97/27306, WO 95/02044, WO 94/21785, WO 93/25671, WO 92/13942 und in Erikson (1997). In einer bevorzugten Ausführungsform des vorgenannten Verfahrens beträgt die Verarbeitungstemperatur 15°C bis 90°C, vorzugsweise 60°C bis 85°C, besonders bevorzugt 65°C bis 75°C.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren das In-Kontakt-Bringen des Holzes oder der Zusammensetzung mit Enzymen oder Verbindungen, die die Qualität des Zellstoffs beeinflussen können. Beispiele für geeignete Enzyme können dem Stand der Technik entnommen werden, z. B. den oben aufgeführten Referenzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nahrungsmittel und Tierfutter, umfassend erfindungsgemäßes Holz oder Fasern davon oder eine erfindungsgemäße Zusammensetzung oder ein Abkömmling davon, der z. B. durch weitere in der Nahrungs- und/oder Tierfuttermittel übliche Verarbeitungsschritte aufbereitet wurde.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung einer Pflanze, die mindestens ein rekombinantes DNA-Molekül enthält, das ein Zellwand-modifizierendes Enzym codiert zur Herstellung von modifiziertem Holz. Um in Genuß der Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens zu kommen, muß der Fachmann nicht unbedingt die Schritte (a) und (b) durchführen, falls z. B. bereits transgene Pflanzen vorhanden sind, die bereits ein Zellwand-modifizierendes Enzym exprimieren, das durch z. B. eine der vorgenannten Methoden in die Pflanze eingebracht worden ist, wobei diese transgene Pflanze vormals nicht unter den Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens kultiviert wurde und daher der Effekt des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht erreicht werden konnte.

Wie oben bereits dargelegt, stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Verfügung, die die in vivo und in situ Modifikation von Holz erlauben und somit die kostengünstige Herstellung von Produkten ermöglicht, die von dem Rohstoff Holz bzw. dessen Verarbeitungsprodukten mittelbar oder unmittelbar abhängig sind. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung einer Pflanze, eines rekombinanten DNA-Moleküls, Holz bzw. Fasern davon und Zusammensetzungen, wie sie in vorstehenden Ausführungsformen beschrieben sind zur Herstellung von Futter- oder Nahrungsmitteln, zur Verringerung der Viskosität von Pflanzenbiomasse, zur Herstellung von Zellstoff und/oder Papier, zum Holz-Zellstoff-Bioleichen, zum Abbau von landwirtschaftlichen Abfällen oder zur Produktion von alkoholischen Brennstoffen.

Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann offenbart und umfaßt durch die Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung. Zum Beispiel kann weiterführende Literatur zu einer der oben angeführten Verfahren, Mittel und Verwendungen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung angewendet werden können, dem Stand der Technik entnommen werden, z. B. aus öffentlichen Bibliotheken unter z. B. der Benutzung von elektronischen Hilfsmitteln. Zu diesem Zweck bieten sich unter anderem öffentliche Datenbanken an, wie die "Medline", die über Internet zur Verfügung stehen, z. B. unter der Adresse <http://www.ncbi.nih.gov/PubMed/medline.html>. Weitere Datenbanken und Adressen sind dem Fachmann geläufig und können aus dem Internet entnommen werden, z. B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.tigr.org/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html oder unter der Adresse <http://www.lycos.com>. Eine Übersicht über Quellen und Informationen zu Patenten bzw. Patentanmeldungen in der Biotechnologie ist in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 gegeben.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1

Stengelwachstum Xylanase exprimierender transgener Tabakpflanzen im Vergleich zum Wildtyp.
Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Herstellung transgener Xylanase exprimierender Pflanzen

Die Herstellung von transgenen Tabakpflanzen (Samsun NN), die konstitutiv eine Xylanase aus *Clostridium thermocellum* (XynZ) in der Zellwand exprimieren, wurde wie in Herbers (1995) BIO/TECHNOLOGY 13, 63-66 beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 2

Zur Durchführung des Freilandexperimentes wurden jeweils 200 Wildtyp-Tabakpflanzen und je 200 Pflanzen der Xylanase-exprimierenden Linien Nr. 34 und Nr. 46 aus Samen der F5 Generation angezogen. 5 Wochen nach Aussaat am 17. April 1997, wurden am 26. Mai 1997 die im Gewächshaus vorkultivierten Pflänzchen ins Freiland auf dem Gelände des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben ausgepflanzt. Die Stengelgröße betrug ca. 3 cm.

Die Stengelhöhe von je 10 Pflanzen der drei Linien wurden über 7 Tage (vom 2.-9. Juli) in der frühen Wachstumsperiode mit einem Zentimetermaß vermessen und die Wachstumsrate/Tag bestimmt. Das Stengelwachstum pro Tag (in cm) betrug 3.8 ± 0.74 (Kontrolle), 2.6 ± 0.48 (34) und 2.5 ± 0.38 (46). Das Ergebnis ist in Fig. 1 dargestellt. Die Längenmessungen der Stengel am 20.08.97 von je 10 Pflanzen jeder Linie vom Wurzelhals bis zur längsten Spitze ergab Gesamtlängen (in cm) von 127.3 ± 4.9 (WT), 104.5 ± 5.9 (34) und 79.4 ± 7.4 (46) (Tabelle 1).

Tabelle 1

Stengelhöhe von Xylanase exprimierenden Pflanzen am 20. 08. 1997. Jeweils 10 Kontroll-Pflanzen und 10 Pflanzen

der Linien 34 und 46 wurden vermessen. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichung sind angegeben.

Pflanze	Stengelhöhe (cm)
Wildtyp	127,30 ± 4,85
Xyn 34	104,50 ± 5,87
Xyn 46	79,36 ± 7,37

5

Nachfolgend wurden Frisch- und Trockengewichtsbestimmungen von Stengeln, einschließlich ihrer Bestandteile Rinde, Holz und Mark (am 20.08., 25.08., 01.09.), durchgeführt. Für die Gewichtsbestimmungen wurde ein 20 cm langes Segment eines Stengels 4 cm oberhalb des Wurzelhalses abgesägt. Dieses wurde gewogen, und anschließend die Rinde mit einem Skalpell abgeschabt. Die Differenz des Gewichtes vor (Gesamt-Stengel) und nach Abschaben der Rinde (Holz und Mark) ergab das Frischgewicht der Rinde. Anschließend wurde das Mark aus dem Holz herausgekratzt, und der Holzanteil gewogen. Der Markanteil ergab sich rechnerisch aus der Differenz zwischen Holz/Mark und dem Holz nach Entfernung des Marks. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden Rinde, Mark und Holz lyophilisiert und nach Trocknung gewogen.

10

15

Tabelle 2

Frishgewichte des Stengels und seiner Anteile in Xylanase exprimierenden Pflanzen

20

Pflanze	Stengel	Rinde	Holz	Mark
Kontrolle	90.3±17.7	31.5±2.4	46.4±3.5	22.1±3.2
34	112.7±16	31.7±2.6	40.9±3.3	29.1±3.0
46	107.1±27	31.6±4.1	42.8±7.1	29.0±6.4

25

30

Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils 30 Pflanzen und entstammen Messungen vom 20. 08., 25. 08. und 01. 09. 1997. Die Anteile von Rinde, Holz und Mark sind Gewichtsanteile in % zum Gesamtgewicht des jeweiligen Stengelsegmentes. Stengelsegmente lagen ca. 2 cm über der Wurzelinitiation und waren 20 cm lang. Das Frischgewicht/20 cm Stengel war in den transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht. Diese Erhöhung wurde durch eine signifikante Steigerung des Marks verursacht (Tabelle 2). Während der Anteil der Rinde am Gesamt-Stengel unverändert blieb, war das FG des Holzes in den Transgenen gegenüber dem der Kontrollen leicht reduziert (Tabelle 2). Der Trockengewichtsanteil der Rinde am Frischgewicht war unverändert. Jedoch war der Trockengewichtsanteil des Marks gegenüber den Kontrollpflanzen leicht und der des Holzes stark gegenüber den Wildtypen reduziert (Tabelle 3).

35

Tabelle 3

40

Trockengewichtsanteil (in % zum Frischgewicht) von Rinde, Holz und Mark in Xylanase exprimierenden Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen

Pflanze	Rinde	Holz	Mark
WT	10.42±0.58	40.58±2.64	7.15±0.56
34	10.34±0.66	35.45±2.25	6.22±0.92
46	10.14±0.53	29.12±3.89	5.36±0.79

45

50

Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils 10 Pflanzen, geerntet am 01.09. 1997.

Aus den oben dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß aufgrund der Expression der Xylanase die Zusammensetzung des Holzes der transgenen Pflanzen signifikant gegenüber der der Wildtyp-Pflanzen verändert ist.

55

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von verändertem Holz umfassend:

60

- (a) Einführung eines rekombinanten DNA-Moleküls in Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzen, wobei das rekombinante DNA-Molekül ein Enzym codiert, das in der Lage ist, Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden zu verändern;
- (b) Regeneration einer transgenen Pflanze aus der Pflanzenzelle, Pflanzengewebe oder Pflanze aus Schritt (a); und
- (c) Kultivierung der Pflanze aus Schritt (b) unter Bedingungen die
 - (i) die Bildung von Holz, und
 - (ii) die Expression des Enzyms erlauben.

65

2. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Kultivierung unter Freilandbedingungen durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Pflanze Tabak, Pinie, Pappel, Eukalyptus, Erbse, Klee, eine Getreidepflanze oder ein Laub- oder Nadelbaum ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Enzym ein hydrolytisches Enzym ist, vorzugsweise eine Cellulase, Hemicellulase, besonders bevorzugt eine Pektinase, Xylanase, Mannanase oder ein Lignin-degradierendes Enzym, z. B. Phenolperoxidase oder Laccase.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Enzym in einer verkürzten Form exprimiert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Enzym de- oder unglykosiliert ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Enzym als Fusionsprotein exprimiert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das DNA-Molekül funktionell mit einer DNA-Sequenz verknüpft ist, die ein Signalpeptid für die Zellwand, die Vacuole, ein Plastid oder Mitochondrium oder das endoplasmatische Reticulum codiert.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Signalpeptid in der Lage ist, das Enzym in ein Zellkompartiment zu dirigieren.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Signalpeptid das Proteinaseinhibitor-II-Signalpeptid, das Patatin-Vacuole-Signalpeptid oder das plastidiäre Transketolase-Transitpeptid ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei das Zellkompartiment der apoplasmatische Raum oder die Vacuole ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Expression oder die Aktivität des Enzyms induzierbar ist, vorzugsweise durch Temperatur, pH-Wert, organische oder anorganische Verbindungen, oder durch Dekompartimentierung.
13. Holz, erhältlich nach einem Verfahren der Ansprüche 1 bis 12 oder Fasern davon.
14. Zusammensetzung umfassend das Holz nach Anspruch 13 oder Fasern davon.
15. Die Zusammensetzung nach Anspruch 14, die weiterhin Pflanzenbiomasse, vorzugsweise Holz oder Fasern davon enthält.
16. Verfahren zur Behandlung von Zellstoff umfassend die Verarbeitung des Holzes nach Anspruch 13 oder Fasern davon oder einer Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 unter geeigneten Reaktionsbedingungen.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Verarbeitungstemperatur 15°C bis 90°C, vorzugsweise 60°C bis 85°C, besonders bevorzugt 65°C bis 75°C beträgt.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, weiter umfassend das In-Kontakt-Bringen des Holzes oder der Zusammensetzung mit Enzymen oder Verbindungen, die die Qualität des Zellstoffs beeinflussen können.
19. Tierfutter, umfassend das Holz nach Anspruch 13 oder Fasern davon oder eine Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 oder ein Abkömmling davon.
20. Verwendung einer Pflanze, die mindestens ein in einem der Ansprüche 1 bis 12 definierten rekombinanten DNA-Moleküle enthält zur Herstellung von modifiziertem Holz.
21. Verwendung einer in Anspruch 20 definierten Pflanze, eines rekombinanten DNA-Moleküls wie es in einem der Ansprüche 1 bis 12 definiert ist, des Holzes nach Anspruch 13 oder Fasern davon, oder der Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 zur Herstellung von Futter- oder Nahrungsmittel, zur Verringerung der Viskosität von Pflanzenbiomasse, zur Herstellung von Zellstoff und/oder Papier, zum Holz-Zellstoff-Biobleichen, zum Abbau von landwirtschaftlichen Abfällen oder zur Produktion von alkoholischen Brennstoffen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1: Stengelwachstum

